

Asignatura: Bioquímica III

Carrera: Bioquímica

Ciclo Lectivo: 2015

Docente/s: Tirso E. Vázquez, Profesor Adjunto(docente coordinador); Georgina Moretti, Jefe de Trabajos Prácticos.

Carga horaria semanal: 7 horas semanales

Tipo de Asignatura: Teórico-práctica

Fundamentación

En el contexto del extraordinario avance de las ciencias, la tendencia a la automatización y la sofisticación tecnológica en el campo de la salud, el sólido conocimiento y comprensión de las bases moleculares implicadas en el fenómeno de la vida permitirán luego comprender e integrar conocimientos de otras asignaturas donde estén implicados los procesos patológicos y las herramientas que luego son aplicadas al diagnóstico bioquímico y molecular.

Objetivos:

El Objetivo principal es que el alumno adquiera una sólida formación básica en los procesos implicados en la transferencia de la información génica, que le permita luego interpretar conocimientos específicos y orientarse dentro de alguna de las especialidades biomédicas de la carrera y como futuro profesional interrelacionar desde su campo, en la vida comunitaria y con los demás actores de la salud.

El objetivo se concreta a través de los siguientes objetivos específicos:

- que el alumno tenga siempre presente el dogma central de la Biología Molecular, columna vertebral de la transmisión de la información biológica.
- que el alumno adquiera el lenguaje específico y conocimientos sobre herramientas básicas de biología molecular para interpretar bibliografía científica y diferentes experimentos que condujeron al conocimiento de temas centrales de la transmisión de la información para la actividad biológica y su regulación.
- que el alumno comprenda el metabolismo del DNA, molécula portadora de la información génica y los mecanismos para que se traspase el material genético de manera íntegra en la reproducción celular. Así como también la estructura, el origen y la herencia de nuestro genoma y sus implicancias en la bioquímica clínica y la salud humana.
- que el alumno comprenda el metabolismo del RNA, desde la regulación de su síntesis en diferentes niveles, la expresión, su procesamiento, degradación y control postranscripcional; sin olvidar que el RNA también es un producto de un gen y algunos poseen actividades biológicas propias.
- que el alumno comprenda el metabolismo de las proteínas, los verdaderos pilares y obreros celulares, ya que su ausencia o desregulación es el causal de las patologías.
- que el alumno refuerce el manejo de laboratorio ya adquirido en otras asignaturas a través del trabajo experimental y que el alumno sepa interpretar

correctamente resultados de diversas técnicas aplicadas facilitándole toma de decisiones de manera consciente y responsable.

Contenidos mínimos:

En el curso se analizan en particular:

- El dogma central de la Biología Molecular, columna vertebral de esta materia que el alumno debe tener siempre presente.
- Herramientas básicas de biología molecular para interpretar los diferentes experimentos y problemas que condujeron al conocimiento de temas centrales de la transmisión de la información para la actividad biológica y su regulación.
- El metabolismo del DNA, molécula portadora de la información génica y los mecanismos para que se traspase el material genético de manera íntegra en la reproducción celular.
- La estructura y origen de nuestro genoma (regiones intragénicas e intergénicas repetitivas o dispersas) y sus implicancias en la bioquímica clínica y la salud humana.
- El metabolismo del RNA, desde la regulación de su síntesis en diferentes niveles, la expresión, su procesamiento, degradación y control postranscripcional; sin olvidar que el RNA también es un producto de un gen y algunos poseen actividades biológicas propias.
- Las Proteínas como expresión de la información genética, y todo el procesamiento y direccionamiento para que posea la actividad biológica en el lugar adecuado.
- Finalmente se abordaran algunas herramientas moleculares útiles para el bioquímico en algunas de las incumbencias de nuestra carrera.

Contenidos Temáticos o Unidades:

Unidad temática 1: Dogma central de la biología molecular y Elementos de DNA recombinante

“Dogma central de la biología molecular”. Esquema general de la replicación y expresión de genes. Concepto de gen.

Métodos y herramientas para la purificación, análisis y manipulación de DNA y RNA: Centrifugación y separación en columnas, “miniprep”, electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida. Enzimas de restricción, mapas de restricción, ligasas, fosfatasa alcalina. Vectores de clonado más difundidos: plásmidos. Marcadores de selección (resistencia a antibióticos y otros.). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Clonado por PCR.

Clonado: construcción de bibliotecas genómicas y bibliotecas de cDNA. Identificación y caracterización de fragmentos de DNA clonados. Otros vectores de clonado (fago , cosmidos, BAC, YAC). Vectores de expresión: elementos esenciales.

Unidad temática 2: Replicación del DNA

Mecanismos y métodos de estudio. Replicación semiconservativa (experimento de Meselson y Stahl). Mecanismo general de replicación: Orígenes de replicación.

Crecimiento de la horquilla de replicación: sentido, unidireccional, bidireccional, continua, discontinua (fragmentos de Okazaki). Métodos experimentales: incorporación de precursores radiactivos, autoradiografía, pulso y lavado de radioactividad (pulse-chase). Esquemas de replicación de DNAs circulares: (theta) y círculo rodante.

Enzimología: Uso de mutantes en el descubrimiento de funciones relacionadas con la replicación. Complementación de funciones in vitro. Etapas de la replicación: inicio, elongación y terminación, proteínas y actividades enzimáticas involucradas: DnaA, helicasas, DnaC, topoisomerasas, SSBP, DNA polimerasas (fidelidad y corrección de errores o proofreading). Estructura y replicación de genomas en eucariotes. Replicación de cromosomas lineales. Telomerasa: estructura y función. Regulación. Regulación en Procariotes. Control de la replicación y ciclo celular. Múltiples replicones.

Unidad temática 3. Reparación y Recombinación del DNA

Mutaciones y reparación del daño en el DNA. Tipos de mutaciones. Cambios numéricos y estructurales de cromosomas. Mutaciones espontáneas e inducidas. Tipos de daño en el DNA. Reparación del DNA en procariotas y eucariotas. Mecanismos de reparación: reversión directa del daño (fotorreactivación), escisión (de bases, de nucleótidos, mismatchrepair), post-replicación (por recombinación, SOS).

Mecanismos moleculares de recombinación. Recombinación homóloga : estructuras de Holliday, ruptura doble cadena, mecanismos. Recombinación sitio específica : integración y escisión del fago , inversión, delección.

Enfermedades relacionadas con los mecanismos de replicación y reparación: Xerodermapigmentoso, ciertos tipos de cáncer, síndrome de Bloom, Anemia Fanconi, síndrome de Werner, Ataxia Telangiectasia (Síndrome de Louis-Barr)

Unidad temática 4. Elementos genéticos móviles y Evolución de genomas

Elementos genéticos móviles. Mecanismos de transposición. Estructuras y mecanismos de transposonesprocarióticos. Transposonesreplicativos y no replicativos. Transposición a través de intermediarios de RNA. Retroelementos (retrovirus, retrotransposones, pseudogenes procesados, etc.).

Evolución de genomas. Evolución de secuencias repetidas en genomas de eucariotas. Genoma nuclear y citoplásmico. Cambios en la estructura del cromosoma. Elementos genéticos móviles el contexto de la dinámica y evolución de los diferentes genomas. Recombinación durante la meiosis y conversión de genes. Unequalcrossingover. Duplicación y Familia de Genes.

Unidad temática 5: Elementos de Genómica y Diagnóstico molecular

Genómica: mapas físicos con distinto grado de resolución, híbridos de células somáticas, FISH, organización de fragmentos extensos de genomas, "contigs", STS, EST, caminata sobre el cromosoma. Genoma humano.

Genética Humana: Mapas genéticos, ligamiento y recombinación desarrollo de marcadores genéticos: RFLP, VNTR (minisatelites), STR o SSR (microsatélites) y SNP,

localización de genes de enfermedades, "lod score", clonado posicional. Enfermedades producidas por expansión de tripletes (mutaciones inestables). GWAS. Diagnóstico genético de enfermedades: test directos para detectar mutaciones mediante PCR, ASO, PCR multiplex, "gene chips", etc; métodos indirectos, rastreo genético, errores del método. Cuantificación microsatélites para determinar dosis génica.

Unidad temática 6: Metabolismo de RNA en procariontes y eucariotas

Generalidades: Propiedades estructurales y funcionales de los diferentes RNAs. Relaciones vida media-función. Terminología: cistrones, secuencias codificantes y marcos de lectura abiertos. Características generales de los mecanismos de transcripción. Iniciación, elongación y terminación en bacterias y en células eucariotes. Inhibidores de la transcripción. Estructura de las RNA polimerasas. Secuencias promotoras.

Métodos de estudio: NorthernBlot, S1 Mapping, Primer extension, Transcripción in vitro, Expresión transitoria, Footprinting con DNasa I, Ensayos de retraso (ElectrophoreticMobilityShiftAssay EMSA).

Mecanismo de transcripción en procariontes:

Mecanismos generales en procariontes. El inicio de la transcripción y el rol de factores sigma. Terminación: Rho dependiente e independiente. Operones: el control fino de la transcripción bacteriana. Operón lactosa (inducción, represión por catabolito, proteína CAP). El operón ara. El operón triptofano. Atenuador.

Cambios mayores en la transcripción bacteriana. Uso de factores sigma alternativos. Cascadas de factores sigma en la esporulación. La RNA polimerasa T7. Control temporal de la transcripción: infección por fagos (clases de genes: tempranos, medios tardíos). Sistemas de dos componentes.

Motivos estructurales de proteínas que se unen a ácidos nucleicos: proteínas con dominios de unión al zinc, dominios de "cierres de leucina" (leucine zipper) y otros (ejemplos).

Mecanismos de transcripción en eucariotas

Estructura genómica y niveles de organización: Nucleosomas, fibras, cromatina y cromosomas; secuencias únicas, moderada y altamente repetitivas.. Heterocromatina (constitutiva y facultativa); Eucromatina (inactiva y activa), propiedades químicas y estructurales de la cromatina activa, sensibilidad a DNasa I, modificación (acetilación, submetilación) de histonas. Niveles de regulación.

Polimerasas eucariotas: RNA pol I, II y III. Estructura de los distintos promotores (rec RNA pol I, II y III). La iniciación de la transcripción por la RNA pol II. TBP, factores generales de transcripción, secuencias "TATA", "CAAT".

Factores de transcripción: Generales, activadores, coactivadores, "enhancers", insulador. Mediador. Estructura modular de los factores de transcripción. Tipos de dominios de interacción a DNA y de activación. Formación de homo y heterodímeros. Estructura modular de promotores. El rol de la heterodimerización en la regulación de la expresión tejido específica y desarrollo. Métodos de clonado de factores de transcripción. Métodos de análisis de patrones de expresión.

Regulación Epigenética. Modificación de histonas, Metilación del DNA, islas CpG, metilación dirigida por sRNA de interferencia. Imprinting (Impronta genómica) y herencia epigenética.

Procesamiento y Degradación de RNAs: Procesamiento de mRNA: Capping y adición de poly A. Splicing: En mitocondrias y plástidos (intrones de grupo I y II), Splicing de mensajeros- El spliceosoma, Splicing alternativo; TransSplicing. Edición de mRNA. Transporte de mRNA: Procesamiento de rRNAs. Procesamiento de tRNAs.

Control postranscripcional de la expresión: Patrones de "splicing" alternativo. Control traduccional: regulación positiva y negativa, cambios en el marco de lectura, estabilidad de los mensajeros. Regulación a nivel del editing. RNA pequeños y silenciamiento postranscripcional.

Unidad temática 7: Traducción

Código genético: Historia de su dilucidación. El código en diferentes organismos y en organelas. Más de 20 aminoácidos. La Tabla de utilización de codones: su significado y aplicación para la expresión de proteínas heterólogas en distintos organismos.

Síntesis de proteínas: Elementos estructurales de los componentes principales de la maquinaria encargada de realizar la síntesis de proteínas: tRNAs, ribosomas.

Esquema general, polaridad (experimento de Dintzis). Sitios en la célula donde se realiza. Aminoacilación de tRNAs. Iniciación, elongación y terminación en eucariotas y procariotas. Energética del proceso. Modelo de ribosoma de tres sitios. Complejos de iniciación de la traducción. Factores de elongación. Fidelidad de la traducción, sitios de control. Inhibidores de la traducción: antibióticos, toxina diftérica. Ciclo ribosómico. Degradación de proteínas por proteasomas.

Tipos de modificaciones postraduccionales. Formación de puentes disulfuro; fosforilación de enzimas con actividad regulada (regulación en "cascada"), adenilación. Modificación de residuos de aminoácidos. Glicosilación, farnesilación (mecanismo, rol y organela celular de procesamiento: retículo endoplasmático y aparato de Golgi).

Direccionamiento y modificación de proteínas, plegamiento y procesamiento. Retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Retículo endoplasmático rugoso (RER) y liso (REL). Aparato de Golgi: estructura y función. Lisosomas y vesículas secretorias. Proteínas de membrana. Proteínas destinadas al núcleo, a mitocondrias y a cloroplastos. Excreción (proteínas del tejido conectivo, colágeno, matriz extracelular, hormonas, etc.).

Diferencias entre la secuencia de DNA y el producto final de la expresión génica: Splicing, RNA editing, translational frameshifting, procesamiento proteolítico, splicing de proteínas (internas), etc. Proteínas precursoras (proproteínas; la insulina), procesamiento proteolítico. Inteínas. Control postranscripcional de la expresión de genes.

Unidad 8: Aplicaciones

Expresión de proteínas recombinantes: Vectores, estrategias para aumentar la expresión, para facilitar la purificación, para facilitar la identificación, sitios de corte. Usos como vacunas y otros biofármacos, o componentes de kits de diagnóstico.

Técnicas de secuenciación de tercera y cuarta generación.

Usos de técnicas de biología molecular en Bioquímica clínica, Microbiología clínica, Bromatología, Toxicología y química legal.

Bibliografía Obligatoria:

Unidad Temática 1: Dogma central de la biología molecular y Elementos de DNA recombinante

Crick, Francis. (1970). The Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227, 561-563

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Miller, J.H., Lewontin, R.C. (2000) *Genética Moderna*. McGraw-Hill - Interamericana de España, SAU. Capítulo 12. Tecnología del DNA recombinante. págs. 341-361

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. (2002). *Biología Celular y Molecular*. 4a Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulo 1. págs. 108-115. Capítulo 7 DNA Recombinante y genómico. págs. 208-253.

Nelson, DL y Cox, M.M. (2009) *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5ta Ed., Ediciones Omega. Parte III, Las Rutas de la Información. págs. 945-950

Unidad temática 2: Replicación del DNA.

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2002). 4a ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulo 12. Replicación, reparación y recombinación del DNA. págs. 453-472.

Nelson, DL y Cox, M.M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5ta Ed. Ediciones Omega. Capítulo 25. Metabolismo del DNA. 25.1 Replicación del DNA. págs. 977-992.

Unidad temática 3. Reparación y Recombinación del DNA

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2002). 4a ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulo 12. Replicación, reparación y recombinación del DNA. págs. 473-493.

Nelson, DL y Cox, M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. (2009) 5ta Ed., Ediciones Omega. Capítulo 25. Metabolismo del DNA. 25.2 y 25.3 Reparación del DNA y Recombinación del DNA. págs. 993-1020.

Unidad temática 4. Elementos genéticos móviles y Evolución de genomas.

Lewin, B. *Genes IX*. (2008). 9na ed. Mc Graw Hill Educación, Interamericana Ediciones. Capítulos 5, 6 y 7 El contenido del genoma, Secuencias Genómicas y número de genes y Agrupamientos y repeticiones. págs 55-127. Capítulos 21 y 22 Transposones; Retrovirus y Retroposones. págs 521-569.

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2002). 4ta Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulos 9 Estructura molecular de genes y cromosomas. págs. 294-332.

Unidad temática 5: Elementos de Genómica y Diagnóstico molecular.

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2005). 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulos 9. Técnicas de genética molecular y Genómica. Identificación y localización de Enfermedades Humanas. págs. 351-360 y 394-403.

Unidad temática 6: Metabolismo de RNA en procariontes y eucariotas

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2005). 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulos Capítulo 11. Control transcripcional de la expresión génica. págs. 447- 531.

Nelson, DL y Cox, M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. (2009) 5ta Ed., Ediciones Omega. Capítulo 26. Metabolismo del RNA. págs. 1021-1095. Capítulo 28. Regulación de la expresión génica. págs. 1115-1158

Voet, G. y Voet, J. *Bioquímica de Voet*. (2006) 3ra Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. Capítulo 29. Transcripción. págs. 908-986

Unidad temática 7: Traducción

Nelson, DL y Cox, M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. (2009) 5ta Ed., Ediciones Omega. Capítulo 27. Metabolismo de las Proteínas. págs. 1021-1114

Bibliografía de consulta:

Nelson, DL y Cox, M.M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. (2009) 5ta Ed., Ediciones Omega. [Traducción de Lehninger Principles of Biochemistry. Nelson, DL y Cox, M.M. (2008) 5th Edition, Part III, Worth Publishers].

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2005). 5ta Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. [Traducción de Molecular Cell Biology. (2004). 5th ed. W.H. Freeman & Co. New York].

Lodish, H, Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. & Darnel, J. *Biología Celular y Molecular*. (2002). 4ta Ed. Editorial Médica Panamericana SA, España. [Traducción de Molecular Cell Biology. (1999). 4th ed. W.H. Freeman & Co. New York].

Voet, G. y Voet, J. *Bioquímica de Voet*. 3ra Ed. (2006) Editorial Médica Panamericana SA, España. [Traducción de Biochemistry by Voet and Voet. (Wiley Publishers, 3rd Ed.).

Lewin, B. *Genes IX*. (2008) McGraw-Hill - Interamericana Editores de España, SAU [traducción de Genes IX (2008) Jones and Barlett publishers inc].

Modalidad de dictado:

Parte Teórica

El profesor de la asignatura realizara una exposición del contenido teórico de los temas. Se marcaran los conocimientos teóricos a profundizar en bibliografía y explicaran conceptos básicos relevantes para desarrollar temas posteriores estudiados. Se complementara la exposición teórica con contenido audiovisual y con problemática del tema para potenciar el aprendizaje (Retroalimentación pregunta-respuesta) de los conceptos expuestos.

Parte Práctica-seminarios de problemas:

La parte práctica consistirá en la discusión grupal de seminarios de problemas donde se busca la integración de contenidos a través de la resolución de problemas por parte de los alumnos durante la clase (con supervisión y orientación de los docentes) y cierre con un recorrido de los contenidos abordados por parte de los docentes.

Es importante comprender que el proceso de enseñanza-aprendizaje implica la participación activa del alumno y el docente en cada una de las etapas de la construcción del conocimiento de la Química Biológica

Trabajo Práctico Experimental

Los alumnos integraran algunos de los conocimientos teóricos desarrollados en el curso a través de la experimentación práctica, tratando de adquirir destrezas para manejarse en el laboratorio y para la resolución de situaciones problemáticas.

Exposición por parte de los alumnos de temas seleccionados de la Carrera

Los alumnos deberán desarrollar un tema específico de la carrera, (a elección de varios sugeridos por los docentes) y exponer el tema a sus compañeros de curso.

Los alumnos realizaran una búsqueda bibliográfica de los temas, una sinopsis de contenidos y un informe del mismo. Los alumnos recibirán un tutelaje y seguimiento del desarrollo de actividades por parte del cuerpo docente

Actividades extra-áulicas

La investigación sobre el aprendizaje demuestra que el alumno aprende como consecuencia de la actividad que desarrolla y de la reflexión que hace sobre ella. La actividad del alumno es así un elemento fundamental del proceso de enseñanza y aprendizaje. Al cuerpo docente le cabe estimularla y favorecerla, planeando y conduciendo al alumno en clases que contengan características e intereses de los alumnos y saquen partido de los recursos existentes. El docente deberá crear las condiciones necesarias para el aprendizaje, utilizando medios como libros especializados, pizarrón, diapositivas, medios audiovisuales, problemas que el alumno perciba con aplicación en su futura vida laboral, materiales de divulgación científica, y computadoras. Pero el alumno deberá aprender fundamentalmente a ordenar su trabajo tanto dentro como fuera del aula, lo que implica resolver tareas y reflexionar sobre ellas, objetivo primordial de la enseñanza a través de la resolución de problemas. Todo ello le ayudara a desarrollar su espíritu crítico, realizar comentarios de las exposiciones y puntos de vista, crear sus propios caminos de resolución y poder realizar preguntas concretas y puntuales en relación con la tarea que debe realizar. Esto es fundamental en el estudio de las ciencias biológicas donde nunca el camino está totalmente cerrado.

El objetivo del trabajo integrador final también va en este mismo sentido, donde además el estudiante como futuro profesional debe poder elaborar un esquema de ordenamiento e integración, priorización de conocimientos y un resumen de una temática y ser capaz de exponerlo y defenderlo frente a sus colegas.

Evaluación:

Parciales Promocionales (PPr)

Numero: 2

Duración: hasta 4 hs.

Observación: suficientes para que el alumno regular apruebe la materia. Constan de ejercicios de interpretación de textos, gráficos y experimentos. Deducción e integración con contenidos teóricos similares a los vistos en los seminarios, tareas realizadas en los TP y preguntas teóricas.

Recuperatorios de Parciales Promocionales (RPPr)

Numero: 2

Duración: hasta 4 hs.

Observación: podrán rendirlo alumnos que no hayan rendido el 1er PPr o 2do PPr por distintas causas. También son suficientes para que el alumno regular apruebe la materia. Constan de la misma metodología de evaluación de los PPr. El alumno que no apruebe tanto el 1er PPr como el 2do PPr perderá la materia.

Recuperatorio Excepcional (RE)

Numero: 1

Duración: hasta 4 hs.

Observación: podrán rendirlo alumnos que adeuden por ausencia justificada el primero o el segundo parcial y no hayan aprobado (PPr o RPPR).

Aprobación de la materia

Promoción directa (sin examen final): el estudiante deberá aprobar la materia con siete (7) o más puntos de promedio entre todas las instancias evaluativas (PPr o RPPR o RE), debiendo tener una nota igual o mayor a seis (6) en cada una de estas.

Exámenes finales:

Duración: hasta 1,5 hs.

Observación: Para el alumno que no aprueba los PPr con un puntaje mayor a siete (7). Y hayan obtenido una calificación de al menos un cuatro (4) La condición para poder rendir el examen final es alcanzar la condición de regular (75% asistencia a clases regulares). Para el alumno que no haya asistido a los TP, se podrá tomar una evaluación de carácter eliminatorio antes de rendir el examen final. El mismo será evaluado por alguno de los profesores de la cátedra y podrá ser escrito, oral o mixto. El alumno aprobará la materia con una nota no inferior a 4 (cuatro puntos).

Nota: Lo que no se encuentra descripto se vale según "Reglamento Académico" detallado en la resolución (RC)43/14.